

## 재조합 균주 *Escherichia coli*가 생산하는 *Bacillus stearothermophilus* No.236 $\beta$ -Xylosidase B의 정제 및 특성

장욱진 · 조쌍구 · 최용진\*  
고려대학교 생명공학원

**Purification and Characterization of  $\beta$ -Xylosidase B of *Bacillus stearothermophilus* No.236 Produced by Recombinant *Escherichia coli*. Chang, Uck-Jin, Ssang-Goo Cho, and Yong-Jin Choi\*.** Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea -  $\beta$ -Xylosidase B was produced by *Escherichia coli* HB101/pKMG12 carrying the *xylB* gene of *Bacillus stearothermophilus* No.236 on its recombinant plasmid. The  $\beta$ -xylosidase B produced was purified by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200 and Superdex 200 HR gel filtration. The purified enzyme showed the highest activity at pH 6.5 and 50°C. But, the enzyme was observed to be very sensitive to the pH and temperature of the reaction mixture. The enzyme was activated about 35% of its original activity in the presence of 1 mM of  $Mn^{2+}$  but it was completely inhibited by  $Ag^+$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Hg^{2+}$  ions. In contrast with the  $\beta$ -xylosidase A, the B enzyme was found to have  $\alpha$ -arabinofuranosidase activity though the activity was fairly low compared with the  $\alpha$ -arabinofuranosidase produced from the *arff* gene of the same *Bacillus stearothermophilus*. Therefore,  $\beta$ -xylosidase B is considered to be more suitable than  $\beta$ -xylosidase A at least for the biodegradation of arabinoxytan. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values of the  $\beta$ -xylosidase B for *o*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-xylopyranoside were 6.43 mM and 1.45  $\mu$ mole/min, respectively. Molecular mass of the enzyme was determined to be about 54 kDa by SDS-PAGE and 160 kDa by Superdex 200HR gel filtration, indicating that the functional  $\beta$ -xylosidase B was composed of three identical subunits.

**Key words:**  $\beta$ -xylosidase B, *xylB*, *Bacillus stearothermophilus*, properties

Xylan은 hemicellulose의 주성분으로 자연계에 cellulose 다음으로 풍부한 분포량을 나타내고 있는 복합 다당류로서 중요한 biomass 자원이 되고 있다. 이와 같은 xylan은 식품, 의약품 및 에너지산업 등에 중요한 잠재 원료가 될 수 있으며 반대로 펄프 및 종이 산업 내지는 환경정화 산업등에서는 xylan의 효율적 분해제거가 중요한 필수 과정이 되고 있다[3, 15, 20].

Xylan의 생물학적 완전분해는 xylan의 복잡한 구조 때문에  $\beta$ -1,4 xylose 주 결합쇄 절단에 관계하는 xylanase (EC 3.2.1.8)와  $\beta$ -xylosidase(EC 3.2.1.37) 두 주요 xylan 분해효소 외에도 각종 측쇄결합 절단에 필요한 효소인 acetylxytan esterase(EC 3.1.1.6),  $\alpha$ -arabinofuranosidase(EC 3.2.1.55) 및  $\alpha$ -glucuronidase(EC 3.2.1.131) 등의 복합적 협동작용에 의해서만 가능한 것이다[17, 21].

본 연구실에서는 상기 xylan 분해관련 모든 효소의 생산능을 가지고 있는 것으로 확인된 강력한 xylan 분해세균인 *Bacillus stearothermophilus* No.236[16]를 토양으로부터 분리하고 xylan 분해 효소 내지는 효소 생산 유

전자에 대한 분자수준의 연구를 계속하고 있다[2, 4, 7, 9]. 특히 *B. stearothermophilus* No.236 균주는 최소한 두 종 이상의  $\beta$ -xylosidase를 생산하며 현재 관계생산유전자인 *xylA*와 *xylB*를 분리, 클로닝하여  $\beta$ -xylosidase A의 효소적 특성과 *xylA* 유전자의 특성을 연구해서 그 결과를 이미 보고한 바 있다[5, 6, 11-13, 18, 19].

본 연구에서는 *xylB* 유전자를 클로닝하고 있는 *E. coli* 재조합균주를 이용,  $\beta$ -xylosidase B를 생산하고 생산 효소를 정제하여 그 효소적 특성을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주 및 시약

$\beta$ -Xylosidase 생산 균주는 *E. coli* HB101/pKMG12 재조합 균주로서 pBR322 플라스미드에 *Bacillus stearothermophilus*  $\beta$ -xylosidase B 생산유전자(*xylB*)를 클로닝한 pKMG12를 도입시킨 균주이다[18]. 그리고 효소기질로 사용한 각종 nitrophenylglycosides와 4-methyl-umbelliferyl- $\alpha$ -D-xylopyranoside 등은 Sigma 회사 제품을 사용하였고 기타 일반 시약류는 시판 1급 이상의 분석용

\*Corresponding author  
Tel. 82-2-3290-3417, Fax. 82-2-923-9923  
E-mail: choiyj@kucncx.korea.ac.kr

시약을 사용하였다.

#### 효소활성 측정

$\beta$ -Xylosidase 활성 측정은 pH 6.5의 0.05 M potassium phosphate buffer 용액에 녹인 10 mM의 *o*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-xylopyranoside(*o*NPX) 기질용액 0.1 ml에 동량의 효소액을 첨가하고 45°C에서 20분간 반응시킨후 0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 2 ml을 첨가, 효소반응을 정지시켰다. 반응 정지 후 효소 반응에 의해 생성된 *p*-nitrophenol을 405 nm에서 비색정량하여 효소 활성을 측정하였으며 상기 조건하에서 1분간에 1  $\mu$ mol의 *p*-nitrophenol을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

$\alpha$ -Arabinofuranosidase 활성 측정은 pH 6.5의 0.05 M potassium phosphate buffer 용액에 녹인 10 mM *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-arabinofuranosidase(pNPA) 기질용액 사용한 것 외에는  $\beta$ -xylosidase 활성 측정 경우와 동일한 과정을 거쳐 효소활성을 측정하였다. 효소 활성 1 unit는 1분 동안 1  $\mu$ mole의 *p*-nitrophenol을 생성하는 효소량으로 하였다.

#### 단백질 정량

크로마토그래피 칼럼 용출액 중의 단백질 정량은 280 nm에서의 O.D.값을 측정하는 자외선 흡광도법 그리고 기타 시료의 경우는 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용한 Lowry 법[10]을 이용하여 단백질양을 측정하였다.

#### 조효소액의 조제

*E. coli* HB101/pKMG12 재조합 균주를 50  $\mu$ g/ml의 ampicillin과 0.5% fructose를 첨가한 5개의 2 l flask에 400 ml씩의 LB 배지에서 37°C, 12 시간 배양하여 얻은 배양액 2 l를 원심분리(5,000 rpm, 20 min)하여 균체를 분리하였다. 분리균체는 50 mM pH 6.5의 potassium phosphate buffer 용액으로 3회 세척한 다음 동일 완충 용액에 현탁시켜 초음파 처리하고(20 kHz, 10 min), 원심분리하여(10,000 rpm, 10 min) 세포파쇄물(cell debris)을 제거한 상등액을 효소정제를 위한 조효소액으로 사용하였다.

#### 효소정제

**Ammonium sulfate 분획** 대부분의 효소활성을 포함하고 있는 것으로 확인된 ammonium sulfate 40-55% 농도에서 침전된 단백질을 분리한 다음(6,000 rpm, 40 min) 소량의 pH6.5의 0.5 M potassium phosphate buffer 용액에 용해시키고 0.05 M의 동일 buffer 용액 중에서 하룻밤동안 투석시켰다.

**DEAE-Sepharose CL-6B 크로마토그래피** 투석이 끝

난 효소용액을 0.05 M 인산완충용액(pH 6.5)으로 미리 평형시킨 DEAE-Sepharose CL-6B column(2.8×13.5 cm)에 흡착시키고 동일완충용액으로 세척한 다음 NaCl gradient(0-0.4 M)를 이용하여 20 ml/h의 용출 속도로 용출시켰다.

**Sephacryl S-200 젤 여과** 이온 교환 크로마토그래피 단계를 거쳐 부분정제된 효소액을 0.05 M potassium phosphate buffer용액으로 미리 평형화시킨 Sephacryl S-200 column(1.6×90 cm)을 사용하여 시간당 10 ml의 속도로 여과 분리하였다(2 ml/tube).

**Superdex 200HR 젤 여과** 젤 여과에 의해 분리된 효소액을 Amicon microconcentrator(cut off; 100,000 Da)을 사용, 농축시킨 다음 Superdex 200HR column을 사용한 FPLC system(Pharmacia Co.)을 이용하여 pH 6.5의 0.05 M potassium phosphate buffer용액을 사용하여 0.2 ml/min의 용출 속도로 최종 정제하였다.

#### 효소의 일반특성 분석

효소 활성 최적온도는 20-70°C 사이에서 5 내지 10°C 간격으로 효소반응을 시킨 다음 효소활성을 측정 비교하여 결정하였다. 효소 활성 최적 pH는 sodium acetate buffer(pH 4.0-6.0), phosphate buffer(pH 6.0-8.0) 및 Tris buffer(pH 8.0-9.0)용액을 사용하여 결정하였다. 또한 정제효소액을 일정 온도에서 보존하면서 1시간 간격으로 소량의 시료를 취하여 잔여 효소 활성을 측정하는 방법을 이용하여 효소의 열안정성을 측정하였다.

#### 전기영동 및 zymogram

효소용액의 순도검정을 위한 전기영동 실험은 8% polyacrylamide을 사용한 SDS-PAGE, 그리고 gel 상의 단백질은 Coomassie brilliant blue R을 사용하여 염색하였다.

또한 zymogram을 위해서 정제된 효소를 SDS-gel에 전기영동 시킨후 25% isopropanol을 첨가한 pH 6.5의 0.05 M potassium phosphate buffer용액으로 30분간 2회 세척후 이를 다시 동일 완충용액으로 2회 더 세척하여 SDS를 완전제거하였다. SDS를 제거한 gel 상에 5 mM 4-umbelliferyl- $\alpha$ -D-xyloside을 포함하고 있는 agarose gel을 덮어 45°C에서 5시간 효소 반응시켰다. 효소활성대는 자외선하에서 관찰하여 촬영하였다.

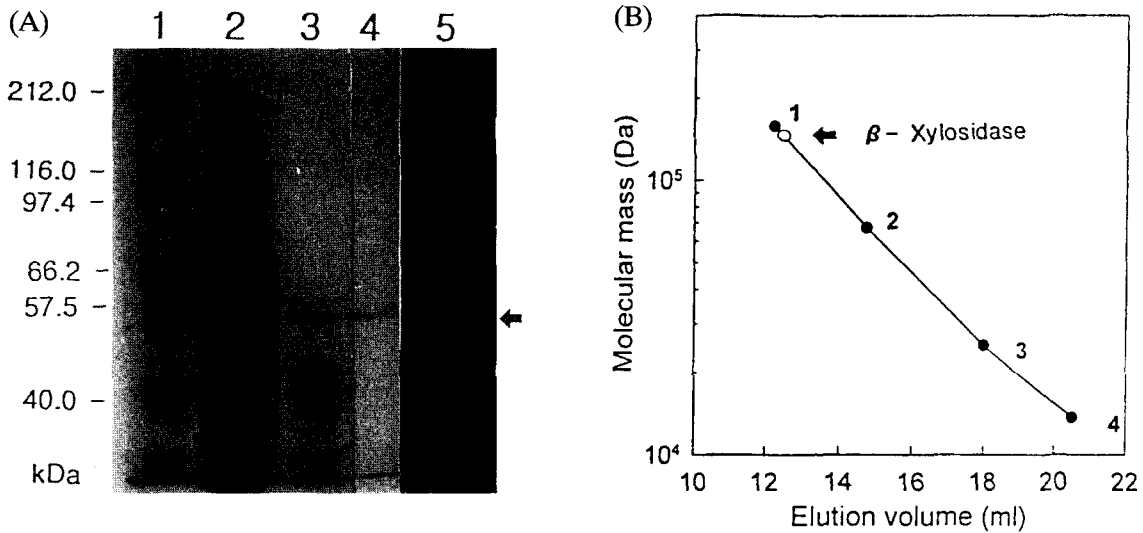
## 결과 및 고찰

#### 효소 정제 및 분자량 측정

50  $\mu$ g/ml ampicillin과 0.5% fructose를 첨가한 배지에서 37°C, 12시간 배양한 *E. coli* HB101/pKMG12 균체를 초음파처리하여 총 314 units의 조효소액을 조제하고

**Table 1. Purification of  $\beta$ -xylosidase B from *Bacillus stearothermophilus* No.236**

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Cell free extract	1,042	314	0.3	100	1
Ammonium sulfate	467	197	0.4	62.7	1.4
DEAE-Sepharose CL-6B	4.5	21.4	4.7	6.8	15.7
Sephacryl S-200	0.6	6.2	10.7	2.0	35.7
Superdex 200HR 10/30	0.1	2.1	17.7	0.7	58.7

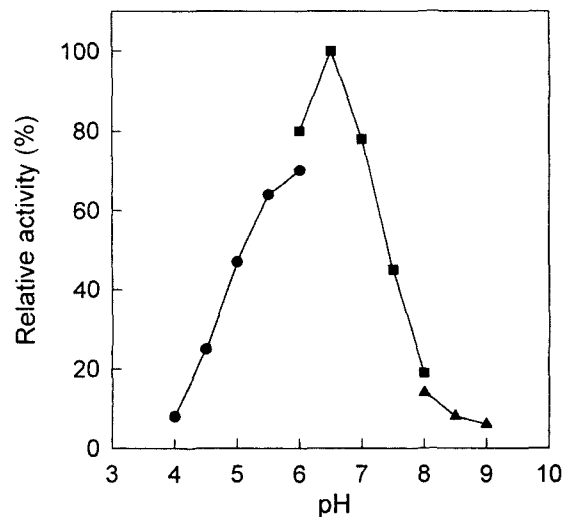


**Fig. 1. SDS-PAGE monitoring of the major steps of the  $\beta$ -xylosidase B purification (A) and molecular weight estimation of the  $\beta$ -xylosidase B by gel filtration (B).**

(A) SDS-PAGE was performed on a 8% polyacrylamide gel. lane 1, protein molecular weight markers; lane 2, crude extract; lane 3, ion exchange column effluent; lane 4, Superdex 200 HR 10/30 effluent; lane 5, zymogram analysis of the lane 4. An arrow indicates the  $\beta$ -xylosidase B.

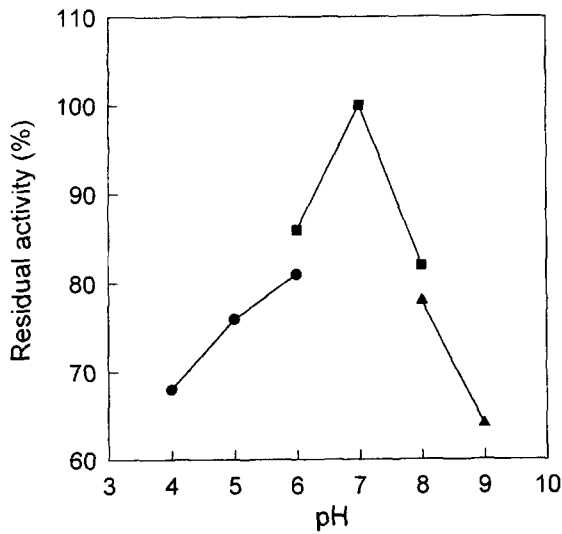
(B) Superdex 200 HR 10/30 column was used. The standard proteins used were as follows: 1, aldolase (158 kDa); 2, bovine serum albumin (66 kDa); 3, chymotrypsinogen A (25 kDa); 4, ribonucleaseA (13.7 kDa). An arrow indicates the purified  $\beta$ -xylosidase B.

Table 1에 요약한 바와 같이 ammonium sulfate 분획 (40-55%), DEAE-Sepharose CL-6B 이온 교환 크로마토그래피, Sephacryl S-200 및 Superdex 200HR 겔 크로마토그래피 과정을 거쳐  $\beta$ -xylosidase B를 정제하였다. 정제효소의 수율은 0.67%에 불과하였으며 비활성은 17.66 units/mg으로서 비활성이 0.31 units/mg였던 정제전의 조효소 용액에 비해 약 59배 정제된 단일 단백질 형태의  $\beta$ -xylosidase B가 분리되었다(Fig. 1A) 또한 Fig. 1A(lane 5)에서 보는 바와 같이 zymogram 실험 결과 약 54 kDa 크기의 단일 단백질대와 효소활성대가 일치함을 보이고 있어 정제효소 단백질이  $\beta$ -xylosidase B임을 확인할 수 있었다. 정제된  $\beta$ -xylosidase B의 분자량은 SDS-PAGE 전기영동법으로는 약 54 kDa(Fig. 1A) 그리고 Superdex 200HR 10/30 gel 여과법에 의해서는 약 160 kDa로 측정되었다(Fig. 1B). 따라서 본  $\beta$ -xylosidase B는  $\beta$ -xylosidase A(200 kDa)와 마찬가지로 세 개의 subunit로 구성되어 있으나 분자 크기는 약간 작은 것으로 분석되었다[11].



**Fig. 2. Effect of pH on the enzyme activity.**

Enzyme activity was measured in various pH range from 4.0 to 9.0 (●, 50 mM acetate buffer; ■, 50 mM phosphate buffer; ▲, 50 mM Tris-Cl buffer). Enzyme reaction was carried out at 45°C for 30 min. Relative activity represents the relative value to the maximum enzyme activity at pH 6.5.

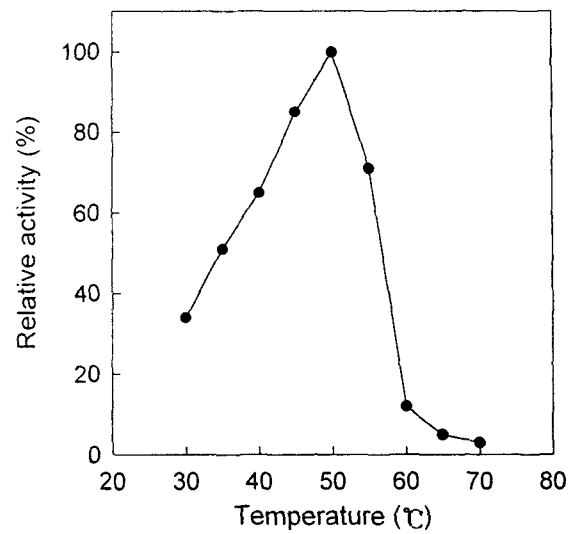


**Fig. 3. Effect of pH on the enzyme stability.** Enzyme solution was incubated at 4°C for 24 h in 50 mM, 50 mM acetate buffer (●, pH 4.0-6.0), 50 mM phosphate buffer (■, pH 6.0-8.0) and 50 mM Tris-Cl buffer (▲, pH 8.0-9.0). After incubation, enzyme reaction was carried out at 45°C for 30 min and then the residual activity was measured.

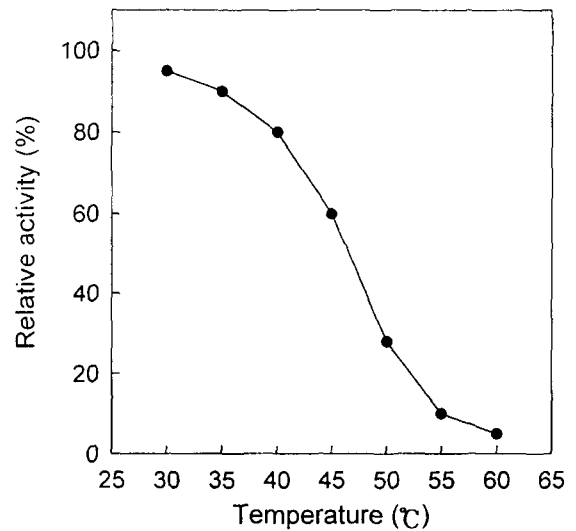
**효소의 일반적인 성질**

**최적 pH** pH 4.0-9.0 범위를 나타내는 세가지 서로 다른 완충용액을 이용하여 β-xylosidase B 활성에 미치는 반응액의 수소 이온 농도의 영향을 조사하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 본 효소는 반응액의 pH가 6.5일 때 가장 높은 효소 활성을 보였으나 최적 pH를 벗어나면 효소활성이 현저히 감소하였으며 반응액의 수소이온 농도에 매우 민감한 특성을 가지고 있었다. 이와 같은 pH효과와는 pH 5.0-8.0 사이의 비교적 넓은 범위의 최적 pH를 나타내는 β-xylosidase A와는 대조적이었다[11]. 그리고 pH 6.0에서 최적 안정성을 나타내는 β-xylosidase A와 비슷하게 본 효소의 안정성에 미치는 pH 효과 분석에서도 중성부근의 pH용액에서 가장 안정함을 알수 있었다 (Fig. 3).

**최적온도 및 열안정성** β-Xylosidase B 활성에 미치는 반응온도의 영향을 조사하여 Fig. 4에 표시되어 있는 바와 같이 50°C에서 가장 높은 활성을 나타내었으며 반응온도에도 매우 민감한 효소인 것으로 분석되었다. 그러나 45°C의 최적온도를 가지고 있는 β-xylosidase A보다는 약간 높은 최적온도 조건을 보이고 있어 *B. stearothermophilus* 21[1]과 *Thermoanarobactor ethanolicus*[14] 등이 생산하고 있는 것으로 보고되고 있는 각각 70 및 92°C에서 최적온도를 지닌 초 고온성 β-xylosidase를 제외하고는 비교적 높은 최적온도를 가진 효소로 분류할 수 있다. 한편 재료 및 방법 항에 설명한 실험과정에 따라 본 효소의 내열성을 조사해 본 결과 Fig. 5와 같이 본 효소는 최적 활성온도인 50°C에서 1시간 열처리



**Fig. 4. Effect of temperature on the enzyme activity.** Enzyme reaction solution in 50 mM phosphate buffer, pH 6.5, was incubated for 30 min at various temperatures as in the figure. Relative activity was determined to be relative value to the activity at 50°C.



**Fig. 5. Effect of temperature on the enzyme stability.** Residual enzyme activity was measured at 45°C for 30 min allowing the enzyme solution to stand at various temperature for 1 h intervals. Relative activity was represented as the percentage of the untreated control activity.

했을 때 약 28% 정도의 잔여 활성을 보임으로서 β-xylosidase A와 마찬가지로 비교적 낮은 열안정성을 가진 것으로 나타났다[11].

**금속이온의 효과** 효소 반응액에 각종 금속 이온을 최종 농도가 1 mM되게 첨가하여 β-xylosidase B 활성에 미치는 금속이온의 효과를 살펴 보았다(Table 2). 본 효소는 Mn<sup>2+</sup>이온에 의해서만 약 35%의 활성화 효과를 보였을 뿐이고 β-xylosidase A 활성에 대해 활성화 효과를 나타

**Table 2. Effect of metal ions on  $\beta$ -xylosidase B activity**

Metal ions	Relative activity (%)
None	100
Ag <sup>+</sup>	2
Ca <sup>2+</sup>	73
Co <sup>2+</sup>	110
Cu <sup>2+</sup>	1
Fe <sup>2+</sup>	107
Fe <sup>3+</sup>	57
Hg <sup>2+</sup>	2
Li <sup>+</sup>	79
Mg <sup>2+</sup>	102
Mn <sup>2+</sup>	135
Zn <sup>2+</sup>	12

Enzyme reaction was carried out 50°C for 20 min in the presence of various metal ions at a final concentration of 1 mM.

**Table 3. Substrate specificity of the  $\beta$ -xylosidase B**

Substrate	Specific activity (U/mg)
<i>o</i> -Nitrophenyl $\beta$ -D-xylopyranoside	9.410
<i>p</i> -Nitrophenyl $\beta$ -D-xylopyranoside	2.513
<i>p</i> -Nitrophenyl $\alpha$ -L-arabinofuranoside	1.673
<i>p</i> -Nitrophenyl $\alpha$ -L-arabinopyranoside	0.046
<i>p</i> -Nitrophenyl $\alpha$ -D-galactopyranoside	0.000
<i>p</i> -Nitrophenyl $\beta$ -D-galactopyranoside	0.000
<i>p</i> -Nitrophenyl $\alpha$ -D-glucopyranoside	0.196
<i>p</i> -Nitrophenyl $\beta$ -D-glucopyranoside	0.000
<i>p</i> -Nitrophenyl $\alpha$ -L-fucopyranoside	0.000
<i>p</i> -Nitrophenyl $\beta$ -D-fucopyranoside	0.000
<i>p</i> -Nitrophenyl $\beta$ -L-fucopyranoside	0.000
<i>p</i> -Nitrophenyl $\beta$ -D-mannopyranoside	0.000
<i>p</i> -Nitrophenyl $\alpha$ -L-rhamnopyranoside	0.000

Substrate specificity was measured by incubating 0.1 ml of each substrate (10 mM) with the same volume of enzyme solution at 45°C for 20 min. Enzyme reaction was terminated by adding 2 ml of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.4 M) and the released nitrophenol was quantitated by measuring absorbance at 405 nm.

내었던 Ca<sup>2+</sup>와 Co<sup>2+</sup>의 존재는 뚜렷한 활성화 효과를 나타내지 않았으며 Ca<sup>2+</sup> 이온에 의해서는 오히려 활성 저해 현상을 보였다. 그리고 Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, 및 Hg<sup>2+</sup>와 같은 중금속 이온에 의해서는  $\beta$ -xylosidase A를 비롯한 다른 일반효소와 마찬가지로 현저한 활성 저해 현상을 나타내었다[11].

### 기질 특이성

각종 nitrophenylglycosides 합성 기질을 이용,  $\beta$ -xylosidase B의 기질 특이성을 조사하여 원 균주인 *B. stearothermophilus* No.236이 생산하는  $\beta$ -xylosidase A [11] 및  $\alpha$ -arabinofuranosidase [7]의 특성과 비교해 보았다. Table 3에 표시되어 있는 바와 같이  $\beta$ -xylosidase의 대표적인 기질이 되고 있는 *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylo-

pyranoside(*o*NPX)와 *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside(*p*NPX) 기질에 대해  $\beta$ -xylosidase B 효소도 A 효소와 마찬가지로 높은 효소 활성을 보였다. 또한  $\beta$ -xylosidase B 효소는 A 효소와 달리 효소 활성은 낮으나  $\alpha$ -arabinofuranosidase의 활성을 가지고 있음을 관찰할 수 있었다. 그러므로 본  $\beta$ -xylosidase B는 일종의 bi-functional enzyme이라고도 할 수 있겠으며, 최소한 arabinoxylan의 분해에 있어서는  $\beta$ -xylosidase B가 A 효소보다 더 효과적일 것이 분명하다.

한편  $\beta$ -xylosidase B 효소의 *o*NPX 기질에 대한 K<sub>m</sub> 값과 V<sub>max</sub> 값은 Lineweaver-Burk plot을 이용해 6.43 mM와 1.45  $\mu$ mol/min로 계산되었으나 같은 기질에 대한  $\beta$ -xylosidase A의 K<sub>m</sub> 및 V<sub>max</sub> 값을 이용할 수 없어 효소반응속도와 관련된 두 주요 parameter 값의 직접 비교는 할 수 없었다.

### 요 약

*Bacillus stearothermophilus* No.236 *xylB* 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드 pKMG12를 가지고 있는 *E. coli* HB101 균주를 이용하여 *B. stearothermophilus*  $\beta$ -xylosidase B를 생산, 정제하고 효소의 일반특성을 조사하였다. Ammonium sulfate 분획, DEAE-Sephacryl CL-6B 이온 교환 크로마토그래피, Sephacryl S-200 및 Superdex 200HR 젤 크로마토그래피의 과정을 거쳐 정제하였으며 정제된 효소는 SDS-PAGE 및 zymogram 실험을 통해  $\beta$ -xylosidase B의 단백질임을 확인하였다. 정제  $\beta$ -xylosidase B는 반응액의 수소이온 농도와 온도에 매우 민감하며 최적 활성 pH 및 온도는 각각 pH 6.5와 50°C로 결정되었다.  $\beta$ -Xylosidase 활성은 1 mM Mn<sup>2+</sup>첨가에 의해 약 35% 활성화 됨을 보였으나 Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 및 Hg<sup>2+</sup> 등의 중금속이온의 존재하에서는 거의 완전한 저해를 나타내었다. 또한 본 효소는 비록 높지는 않으나  $\alpha$ -arabinofuranosidase 활성도 가지고 있어 *B. stearothermophilus* No 236의  $\beta$ -xylosidase A 효소 보다 최소한 arabinoxylan의 분해에 있어서 더 우수한 효소로 판단되며 *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside 기질에 대한 K<sub>m</sub> 값과 V<sub>max</sub> 값은 각각 6.43 mM과 1.45  $\mu$ mol/min로 계산되었다. 한편,  $\beta$ -xylosidase B 분자량은 gel 여과법으로는 약 160 kDa, 그리고 SDS-PAGE에 의해서는 약 54 kDa로 측정되어 본 효소는 trimer의 구조를 가지고 있음을 알 수 있었다.

### REFERENCES

1. Baba, T., R. Shinke, and T. Nanmori. 1994. Identification and characterization of clustered genes for thermostable xylan-degrading enzymes,  $\beta$ -xylosidase and xylanase of

- Bacillus stearothermophilus* 21. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2252–2258.
2. Bae, S. H. and Y. J. Choi. 1991. Purification and characterization of extracellular xylanase of *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 592–597.
  3. Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286–290.
  4. Cho, S. G., S. S. Park, Y. I. Park, and Y. J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of an endo-xylanase gene from *Bacillus stearothermophilus* into *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 271–279.
  5. Cho, S. G. and Y. J. Choi. 1997. Catabolite repression of the *Bacillus stearothermophilus*  $\beta$ -xylosidase (*xylA*) in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 21–27.
  6. Cho, S. G. and Y. J. Choi. 1997. Regulation of  $\beta$ -xylosidase (*XylA*) synthesis in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 14–20.
  7. Eom, S. J., S. G. Cho, and Y. J. Choi. 1995. Purification and characterization of the  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase *Escherichia coli* cells harboring the recombinant plasmid pKMG 11. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 446–453.
  8. Gasparic, A., J. Martin., A. S. Daniel, and H. J. Flint. 1995. A xylan hydrolase gene cluster in *Prevotella ruminicola* B14: Sequence relationships, synergistic interactions, and oxygen sensitivity of a novel enzyme with exoxylanase and  $\beta$ -(1,4)-xylosidase activities. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2958–2964.
  9. Kim, I. S., S. G. Cho, and Y. J. Choi. 1993. Molecular cloning and expression of the acetyl xylan esterase gene of *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 542–548.
  10. Lowry, O. H., N. J. Rasebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
  11. Mun, A. R. and Y. J. Choi. 1992. Purification and characterization of exo-xylanase from *Escherichia coli* cells harboring the recombinant plasmid pMG1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 574–582.
  12. Oh, H. J. and Y. J. Choi. 1994. Sequence analysis of  $\beta$ -D-xylosidase gene from *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 134–142.
  13. Oh, S. W., S. S. Park, Y. I. Park, and Y. J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of *Bacillus stearothermophilus*  $\beta$ -D-xylosidase gene in *E. coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 136–134.
  14. Shao, W. and J. Wiegel. 1992. Purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *J. Bacteriol.* **174**: 5848–5853.
  15. Singh, P. S. 1979. Principles of pulp bleaching, pp. 15–28. In P. S. Singh(ed.), *The Bleaching of Pulp*, 3rd ed. Tappi Press, Atlanta.
  16. Song, H. S. and Y. J. Choi. 1989. Production of xylanase by *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 289–294.
  17. Suh, J. H., S. G. Cho, and Y. J. Choi. 1996. Synergic effects among endo-xylanase,  $\beta$ -D-xylosidase, and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 179–183.
  18. Suh, J. H., S. G. Cho, and Y. J. Choi. 1996. Molecular cloning and expression of the  $\beta$ -xylosidase gene (*xylB*) of *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 331–335.
  19. Suh, J. H. and Y. J. Choi. 1994. Chemical modification of the  $\beta$ -D-xylosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 636–642.
  20. Trubacek, I. and A. Wiley. 1979. Bleaching and pollution, pp. 423–461. In P. S. Singh(ed.), *The Bleaching of Pulp*, 3rd ed. Tappi Press, Atlanta.
  21. Wong, K. K. Y., L. U. L. Tan, and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of endo-xylanase,  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications. *Microbiol. Rev.* **52**: 305–317.

(Received February 27, 1998)